



## Nagoya City University Academic Repository

学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第1511号
学 位 記 番 号	第1082号
氏 名	加藤 寛之
授 与 年 月 日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis (Connexin32 の機能低下は Dusp1-Erk 制御機構の活性化を介しエタノール 関連肝発がんを促進する)</p> <p>Oncotarget, 7: 2009-2021, 2016</p>
論文審査担当者	主査： 城 卓志 副査： 竹山 廣光, 高橋 智

## 論文内容の要旨

【背景・目的】 アルコール摂取は国際がん研究機関 (IARC)によるリスク分類にて Group1 (ヒトへの発がん性が認められる)とされているが、肝臓におけるアルコール関連肝発がん機構の解析は十分でない。肝の主要なギャップ結合タンパクである **Connexin 32 (Cx32)**は、細胞の増殖、分化及び恒常性の制御を行っており、肝硬変、肝細胞癌などのヒト慢性肝疾患が進行する過程でその発現が低下する事が知られている。当研究室では以前に、肝特異的に変異 **Cx32** 遺伝子を発現させることで細胞間連絡能を低下させた **Cx32** ドミナントネガティブトランスジェニック (**Tg**)ラットモデルを樹立し、**Tg** ラットが肝発がん物質に高感受性であることを示してきた。本研究では **Tg** ラットを用いて **Cx32** のアルコール肝発がんに対する修飾作用の検討と、アルコール肝発がんメカニズムの解析を行った。

【方法】 9 週齢雄 **Tg** と同腹の野生型 (**Wt**)ラットに肝発がん物質である **diethylnitrosamine** (200 mg/kg)を腹腔内投与後、1%、5%の **ethanol (EtOH)**を 16 週間飲水投与した群と対照群の肝を用いて、腫瘍の発生、遺伝子及びタンパク発現解析を行った。

【結果】 **EtOH** 投与における **Tg**、**Wt** ラット共に体重減少などの毒性変化は見られなかった。肝腫瘍発生を見ると、**Wt** ラットでは **EtOH** 投与による明らかな影響は認められなかったが、**Tg** ラットでは **EtOH** 投与により有意に肝細胞腺腫、肝細胞癌の **incidence** や **multiplicity** が増加した。ラット肝前癌病変の指標となる **glutathione S-transferase placental form (GST-P)**陽性細胞巢は、**Wt** ラットと比較し **Tg** ラットで有意に面積が増大していたが、**EtOH** 投与による有意な差は **Wt**、**Tg** ラット共に認められなかった。しかし、**Tg** ラットの **EtOH** 投与群では **GST-P** 陽性細胞巢内において細胞増殖マーカーである **Ki67** の陽性率が有意に上昇し、**Wt** ラットではその傾向は見られなかった。**Western blot** 解析では、**Tg** ラットの 5%**EtOH** 投与群において肝における **pErk**、**pElk1**、**cyclinD1** タンパク発現の上昇を認めた。免疫組織学的には、**Tg** ラットでは **GST-P** 陽性細胞巢内での核小体 **pErk** の陽性率が **Wt** ラットと比較して有意に上昇し、さらに **Tg** ラットでは **EtOH** 投与群で有意に上昇していた。**Microarray** 解析により **Erk** の抑制因子である **Dual specificity protein phosphatase 1 (Dusp1)** が **EtOH** 投与により発現低下する遺伝子として同定され、**Tg**、**Wt** ラットいずれにおいても **EtOH** 投与群で **mRNA** 及びタンパクレベルでの発現低下が見られた。さらに **laser microdissection** により凍結切片から **GST-P** 陽性細胞巢を回収し、前がん病変内での **Dusp1** の **mRNA** 発現を検討すると、**Tg** ラットの 5%**EtOH** 投与群で同処置の **Wt** ラットと比較し、有意に発現が低下していた。免疫組織学的には、**Tg** ラットは **Wt** ラットと比較し、有意に **GST-P** 陽性細胞巢内の **Dusp1** タンパク発現が低下しており、さらに **Tg** ラットでは **EtOH** 投与により有意に発現が低下していた。肝細胞癌及び **GST-P** 陽性細胞巢内での **pErk** と **Dusp1** の発現の関係性をより詳細に見るために **GST-P/ pErk/ Dusp1** の三重蛍光免疫染色を行った。その結果、肝細胞癌内における **pErk** の核小体への局在と **Dusp1** の発現低下が観察された。また、**GST-P** 陽性細胞巢内を各群で比較すると、肝細胞癌と同様の **pErk** の発現上昇と **Dusp1** の発現低下をみる **GST-P** 陽性細胞巢は **Tg-5%EtOH** 群で多く観察された。

【結論】 **Tg** ラットを用いる事により、アルコールによる肝発がん促進効果をラットモデルで観察することができ、肝細胞癌の発生を有意に上昇させた。さらにその解析によりアルコール投与や **Cx32** の発現低下が前がん病変内での **Dusp1** 発現を低下させ、それに引き続く **Erk** の活性化を惹起し、さらに前がん病変内での細胞増殖を引き起こすことが肝発がんに関与している事が示唆された。**Dusp1** の発現低下とアルコール発がんの関係は本研究で初めて報告するが、過去の論文にてヒトの肝細胞癌において **Dusp1** の発現低下は予後不良因子であり、さらに **Dusp1** のノックア

ウトマウスでは肝における脂肪産生が亢進するなど脂肪肝との関連も報告されている。以上より **Dusp1** は今後肝疾患における治療ターゲットとなり得ることが期待され、**Tg** ラットはアルコール発がん研究に短期間で肝細胞癌を惹起できる有用なモデルであることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】アルコール摂取は WHO 国際がん研究機関 (IARC) によるリスク分類にて Group1 (ヒトへの発がん性が認められる) とされており、非ウイルス性肝細胞癌の約 50% はアルコールが原因とされている。しかしながら、アルコール関連肝発がん機構の解析は未だ十分ではない。肝の主要なギャップ結合タンパクである Connexin 32 (Cx32) は、細胞の増殖、分化及び恒常性の制御を行っている。実験病態病理学教室では以前に、肝特異的に変異 Cx32 遺伝子を発現させることで細胞間連絡能を低下させた Cx32 ドミナントネガティブトランスジェニックラット (Tg) モデルを樹立し、Tg が肝発がん物質に高感受性であることを示してきた。本研究では Tg を用いて Cx32 のアルコール肝発がんに対する修飾作用の検討と、アルコール肝発がんメカニズムの解析を行った。

【方法および結果】9 週齢雄 Tg と同腹の野生型ラット (Wt) に肝発がん物質である diethylnitrosamine (200 mg/kg) を腹腔内投与後、1%、5% の ethanol (EtOH) を 16 週間飲水投与した群と対照群を設けた。Wt では EtOH による肝腫瘍発生に明らかな影響はみられなかったが、Tg では EtOH により肝細胞腺腫、肝細胞癌の発生頻度・個数が有意に増加した。ラット肝前癌病変の指標となる glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の大きさは、Tg で有意に増大していたが、EtOH による有意差は Wt、Tg 共にみられなかった。しかし、Tg では GST-P 陽性細胞巢内の Ki67 陽性率が EtOH により有意に上昇し、Wt ではその傾向はみられなかった。Tg-5%EtOH 群の肝ではウエスタン解析により pErk、pElk1、cyclinD1 タンパク発現の上昇を認めた。免疫染色では、pErk は Tg における GST-P 陽性細胞巢の核小体内にみられ、その陽性率は EtOH 群で有意に上昇していた。Microarray 解析により Erk の抑制因子である Dual specificity protein phosphatase 1 (Dusp1) が EtOH によって発現低下する遺伝子として同定され、Tg、Wt いずれにおいても EtOH 群で mRNA 及びタンパクレベルでの発現低下が観察された。さらに microdissection 法を用いて GST-P 陽性細胞巢内での Dusp1 mRNA 発現を検討すると、Tg-5%EtOH 群で同処置の Wt と比較し、有意に低下していた。また、GST-P 陽性細胞巢内の Dusp1 タンパク発現は Tg で有意に低下しており、さらに Tg の中では対照群に比較して EtOH 群で有意に低下していた。GST-P/pErk/Dusp1 三重蛍光免疫染色を行って検討すると、肝細胞癌、Tg-5%EtOH 投与群の GST-P 陽性細胞巢内では、Dusp1 の発現低下とともに核小体内 pErk を認めたが、他群では同様の発現パターンを呈する GST-P 陽性細胞巢は少数であった。

【結論】Tg ではアルコールによる肝発がん促進効果が観察され、短期間で肝細胞癌を惹起できる有用なアルコール肝発がんモデルであることが示された。さらにアルコールや Cx32 機能低下は肝前癌病変における Dusp1 発現低下を誘発し、それに伴う Erk の活性化を惹起することで細胞増殖活性が亢進され、発がん促進に寄与している事が示唆された。

【審査内容】主査の城教授からは、Tg ラットの作製方法、Cx32 機能を低下させる事で発がん感受性が高まるメカニズムは何か、今回のラットはヒトのどのような病態を表現するモデルとなるのか、など 9 項目、第一副査の竹山教授からは、pErk 発現上昇に伴う細胞増殖亢進のみで本当に発がんするのか、Cx32 が Dusp1 発現を低下させるメカニズムは何か、など 8 項目、さらに第二副査の高橋教授からは、肝発がん要因にはどのようなものがあるか、がん予防の概念・分類など 3 項目についての質問があった。これらの質問に対して学位申請者からおおむね満足のできる回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解し、専門領域に関する知識も十分持ち得ているものと判断した。本研究は、アルコール関連肝発がんにおいて、Cx32 機能低下状態ではその発がんを促進される事が示し、その過程において Dusp1-pErk シグナル経路の活性化が重要である事を明らかにした。よってこれらの新しい知見を報告した本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与されるに相応しいと判断した。